

subárea 1.06.01 - Química orgânica.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper hispidinervum* (Piperaceae)

Luiz Roberto M. Albuquerque^{1*}, Max Pereira Gonçalves¹, Patrícia Nirlane da Costa Souza¹, Karla Taisa Pereira Colares²

1. Professor Doutor do Instituto de Ciência e Tecnologia I&CT da UFVJM - Campus Janaúba

2. Técnica do Instituto de Ciência e Tecnologia I&CT da UFVJM - Campus Janaúba

Resumo:

Neste trabalho objetivou-se avaliar a caracterização, quantificação e atividade antioxidante, por diferentes métodos, do óleo essencial (OE) de *Piper hispidinervum* pertencente a família Piperaceae. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação por arraste a vapor e a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) indicou uma maior concentração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e monoterpenos. Os constituintes químicos majoritários encontrados no OE foram Terpinoleno (11,77%) e Safrol (82,22%). Os óleos essenciais estudados apresentaram baixa capacidade antioxidante para os testes de poder redutor, fosfomolibdênio, radical hidroxil e potencial de inibição do radical ABTS^{•+}. Porém, houve uma diferença entre os resultados obtidos pelos métodos de avaliação antioxidante. Desta forma, os testes indicam que a avaliação do potencial antioxidante depende do método utilizado.

Palavras-chave: Safrol, Hidrodestilação, Caracterização

Apoio financeiro: FAPEMIG, UFVJM.

Introdução:

A família Piperaceae pertence ao grupo das angiospermas, sendo constituída por mais de 10 gêneros e 1500 espécies¹. Deste total, foram encontradas no Brasil cerca de 170 espécies que são utilizadas, entre outras aplicações, na medicina popular como inseticida e anti-séptico². Estudos fitoquímicos das espécies da família Piperaceae demonstraram a presença de diferentes compostos, dentre os quais destacam-se os alcalóides, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, flavonóides, saponinas e triterpenos³.

O Brasil tem a maior biodiversidade vegetal do mundo, com mais de 55 mil espécies de plantas catalogadas, de um total de 550 mil espécies⁴. No entanto, somente 8% têm sido estudadas na procura de compostos bioativos⁵.

O grande incremento do uso de plantas para fins medicinais tem provocado renovado interesse pelo conhecimento das características das substâncias delas originadas. Incluindo sua composição química, propriedades farmacológicas e controle de qualidade, especialmente quando se trata de plantas brasileiras considerando a extensa e diversificada flora do país⁶.

Devido à imensa flora e aos aspectos culturais do uso de plantas na forma de extratos brutos ou infusões, bem como do óleo essencial extraído da planta ou de uma parte dela, sua utilização tornou-se prática muito comum no tratamento de infecções no Brasil⁷. Essa diversidade química e as diferentes bioatividades das plantas vêm trazendo o desenvolvimento de centenas de novos fármacos⁸.

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos que conferem aromas agradáveis e sabores característicos. Apresentam-se à temperatura ambiente como líquidos oleosos de alta volatilidade, diferenciando-os dos óleos fixos. De uma maneira geral os óleos essenciais são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar e metais⁹.

Os fatores genéticos são primordiais para a determinação da composição dos óleos essenciais. No entanto, fatores ambientais, como sazonalidade, temperatura, radiação, nutrientes, altitude, entre outros, podem causar variações significativas na composição química dos óleos essenciais¹⁰.

Os óleos essenciais atuam como sinais de comunicação química com o reino vegetal e armas de defesa contra o reino animal. Essas características biológicas tornam as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas, sendo largamente estudadas na agricultura por apresentarem atividades bactericidas, inseticidas, fungicidas e antioxidante¹¹.

O objetivo deste trabalho foi avaliar qualitativamente e quantitativamente a composição química dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum*, bem como a sua capacidade antioxidante frente a diferentes métodos.

Metodologia:

O material vegetal, *P. hispidinervum*, foi coletada na cidade de Lavras-MG/Brasil, no Horto florestal do campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período da manhã e na ausência de chuvas. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 4 litros, por um período de 2 horas conforme metodologia descrita

pela Farmacopeia Brasileira¹². O material obtido foi centrifugado por 5 minutos, e, o óleo foi acondicionado em frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração.

A identificação e quantificação dos óleos essenciais foi realizada no Departamento de Química da UFLA, utilizando-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-17A acoplado à espectrômetro de massas (CG/EM - Shimadzu, modelo QP 5050), o equipamento foi operado nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida com fase ligada DB5 (30m x 0,25mm e 0,25µm de espessura de filme); com hélio (1 mL/min) como gás de arraste. A temperatura inicial da coluna de 40°C, seguido de um aumento de 3°C min⁻¹ até atingir 240°C. A temperatura do injetor foi de 220°C e do detector 240°C; pressão na coluna de 100,2 KPa; taxa de partição 1:10 e volume da amostra injetada de 1,0 µL diluída em diclorometano (1% v/v), sendo a quantificação de cada constituinte obtida por meio de normalização de áreas (%).

Para a espectrometria de massas (EM) as condições foram: O detector de captura de íons foi operado em modo de impacto eletrônico com uma energia de impacto de 70 eV, velocidade de decomposição de 1000; intervalo de varredura de 0,50 e detecção de fragmentos na faixa de 40 a 450 Da. Foi injetada, nas mesmas condições da amostra, uma série de padrões de hidrocarbonetos (nC8 - nC20). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e o índice Kovats calculado para cada constituinte¹³.

Para avaliação da capacidade antioxidante foi realizada medindo-se a capacidade de captura dos radicais ABTS e Radicais hidroxila, capacidade de redução do complexo de molibdênio e pela habilidade em doar elétrons para estabilizar os radicais livres - Poder redutor. A atividade antioxidante do óleos essencial foi comparada com a atividade dos padrões de BHT, ácido ascórbico e manitol, compostos com reconhecida atividade antioxidante. e todas as análises foram realizadas em triplicata.

O teste de atividade antioxidante pelo método do cátion radical ABTS•+ (2,2'-azino-bis(ácido-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) foi realizada de acordo com o descrito na literatura¹⁴. Para o ensaio, 20 µL de óleo essencial foram adicionados a 1980µL da solução do radical ABTS•+. A absorvância foi monitorada espectrofotometricamente a 735 nm (Shimadzu UV-160), durante 6 min. A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical ABTS•+ atuaram como controle negativo.

Para a realização do teste antioxidante complexo fosfomolibdênio, uma alíquota de 0,1 mL do óleo essencial diluído em etanol foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 1 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio). Os tubos foram tampados e incubados em um banho-maria a 95°C durante por 60 min. Após o resfriamento, foi realizada a leitura dos tubos em um comprimento de onda de 695 nm. Os valores da capacidade antioxidante dos óleos essenciais foram comparados com uma curva para várias concentrações de ácido ascórbico (0,813; 1,625; 3,25; 6,5; 13; 26 µg mL⁻¹) e os resultados, expressos em equivalentes mg de ácido ascórbico por mL de óleo essencial¹⁵.

Para a realização do teste de Poder Redutor adicionou-se em um tubo de ensaio uma alíquota de 50 µL do óleo essencial, 0,5 mL de solução tampão de fosfato (pH = 7,4) e 0,5 mL de ferricianeto de potássio a 1%. Após o aquecimento a 50°C durante 30 minutos, foram adicionados 0,5 mL de ácido tricloroacético a 10%, 1,5 mL de água destilada e 0,3 mL de cloreto férrico, a mistura final foi agitada e a sua absorvância foi medida a 700 nm (Shimadzu UV-160). A atividade antioxidante dos óleos essenciais foram comparadas com uma curva padrão para várias concentrações de Ácido ascórbico (AA) (0,406; 0,813; 1,625; 3,25; 6,5; 13 e 26 µg mL⁻¹). Os resultados foram expressos em equivalentes mg de Ácido ascórbico por mL de óleo essencial.

O ensaio de atividade captadora do radical OH• (hidroxil) foi realizado de acordo com a seguinte metodologia^{16,17}. A mistura de reação foi preparada com 10 mM de FeSO₄•7H₂O, 10 mM de EDTA, 10 mM de 2-desoxirribose, 0,1 M de tampão fosfato e a amostra de óleo essencial em um tubo de ensaio, totalizando um volume de 1,8 mL. Posteriormente, 200 µL de H₂O₂ foram adicionados à mistura, a qual foi incubada a 37°C durante 2 horas. Após o resfriamento do tubo de ensaio, foram adicionados 1 mL de ácido tricloroacético (3%) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (1%), que foi novamente aquecido em banho-maria (95°C) durante 10 min. Depois de esfriar até a temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 532 nm em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-160).

Resultados e Discussão:

O rendimento do óleo essencial obtidos das folhas frescas das espécies *Piper hispidinervum*, foi de 2,27%. Na literatura encontramos diferentes resultados para o rendimento obtido. Estudos demonstraram um rendimento de 3,0% para *P. hispidinervum*¹⁸. Essa diferença dos rendimentos e muitas vezes da composição química dos óleos essenciais de plantas da mesma espécie se deve a fatores genéticos e edáficos que interferem no metabolismo das plantas^{18,19}. Como os estudos são realizados em regiões diferentes não são anormais os resultados obtidos.

Foram identificação e quantificados doze constituintes químicos do óleo essencial de *Piper hispidinervum* representando 99,89% do total de compostos. A análise dos constituintes químicos mostrou que os os compostos majoritários foram, Terpinoleno (11,77%) e Safrol (82,22%). E os constituintes mionritários encontrados foram: α-pineno (0,41%), β- pineno (0,38%), Mirceno (0,26%), δ-careno (1,05%), α-terpineno (0,38%), Limoneno (0,44%), (Z)-β-ocimeno (0,47%), (E)-β-ocimeno (1,13%), γ-terpineno (0,40%), Bicyclgermacreno (0,98%).

Alguns estudos identificaram uma composição de 82,5% de safrol e (13,38%) de α-terpinoleno no óleo essencial de *P. hispidinervum*²⁰. Esse e outros dados indicam que o óleo essencial desta espécie é rico em safrol (92%) e que essa substância concentra-se, principalmente, nas folhas e nos ramos secundários²¹. Esses

dados correspondem aos resultados encontrados neste trabalho.

O óleo essencial de *P. hispidinervum* apresentou um percentual de atividade antioxidante (%AA) 6,59%, na concentrações de 100 µg mL⁻¹, para o método que envolve a inibição do radical ABTS•+. Desta forma, apresentando uma baixa atividade antioxidante para o método empregado.

A atividade antioxidante do OE por meio da redução de Molibdênio (VI) para Molibdênio (V) foi apenas de 0,065g mL⁻¹ equivalente de ácido ascórbico. Os resultados para o teste de poder redutor indicam que a espécie avaliada possui a baixa capacidade para reduzir o (Fe³⁺) em (Fe²⁺).

Podemos observar que o óleo de *P. hispidinervum* alcançou a maior porcentagem de inibição do radical hidroxil com 33,75 % de inibição. Comparando-se esses resultados com aqueles obtidos para o método potencial de inibição do radical ABTS•+ podemos perceber que o resultado depende do tipo de radical formado pelos reagentes de cada método²².

Conclusões:

O óleo essencial de *Piper hispidinervum* apresentou uma predominância de sesquiterpenos e monoterpenos entre eles os mais abundantes foram Terpinoleno (11,77%) e Safrol (82,22%). Os resultados dos teste de atividade antioxidante do óleo essencial de *Piper hispidinervum* indicam que este possui um baixo potencial antioxidante e que a avaliação do potencial antioxidante depende do método utilizado.

Referências bibliográficas

- 1- CRONQUIST, A. **AN INTEGRATED SYSTEM OF CLASSIFICATION OF FLOWERING PLANTS**. Columbia University Press. New York, 1981.
- 2- SILVA, D.M.H.; BASTOS, C.N. **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE PIPER SOBRE CRINIPPELLIS PERNICIOSA, PHYTOPHTHORA PALMIVORA E PHYTOPHTHORA CAPSICI**. Fitopatologia Brasileira v. 32, p. 143-145, 2007.
- 3- EVANILSON, G.P.; LANA, A.J. D.; LIMA, R. A. **PHYTOCHEMICAL STUDY OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF PIPER TUBERCULATUM JACQ. ON STRAINS OF *Escherichia coli* in vitro**. South American Journal of Basic Education, Technical and Technological v. 3, n.2, p. 27-36, 2016
- 4- ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. **'MEDICINAL PLANT GENETIC RESOURCES AND INTERNATIONAL COOPERATION: THE BRAZILIAN PERSPECTIVE'**. Journal of Ethnopharmacology, vol. 51, p. 11-120, 1996.
- 5- GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.V.S.; SANTOS, R.R. **FARMACOGNOSIA: DA PLANTA AO MEDICAMENTO**. Campinas. Editora da UFSC, Santa Catarina, Brazil, 1996.
- 6- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. **FÁRMACOS E FITOTERÁPICOS: A NECESSIDADE DO DESENVOLVIMENTO DA INDÚSTRIA DE FITOTERÁPICOS E FITOFÁRMACOS NO BRASIL**. Quim. Nova, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.
- 7- CALIXTO, J.B. **EFFICACY, SAFETY, QUALITY CONTROL, MARKETING AND REGULATORY GUIDELINES FOR HERBAL MEDICINES (PHYTOTHERAPEUTIC AGENTS)**. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- 8- LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.K.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C.V. **EFFECTS OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS ON GROWTH OF LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS AND TRYPANOSOMA CRUZI**. Rev. Bras. Cienc. Farm., v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.
- 9- SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G. MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **FARMACOGNOSIA: DA PLANTA AO MEDICAMENTO**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 1102p, 2004.
- 10- GOBBO-NETO, L. AND LOPES. N.P. **PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**. Quimica Nova, 30, 374-381, 2007.
- 11- SAITO, M.L.; SCRAMIN, S. **PLANTAS AROMÁTICAS E SEU USO NA AGRICULTURA. JAGUARIÚNA**: Embrapa Meio Ambiente, 48p, 2000.
- 12- Farmacopeia Brasileira. **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**. Brasil/Brasília: Anvisa. v. 2, p.546, 2010.
- 13- ADAMS, R.P. **IDENTIFICATION OF ESSENTIAL OIL COMPONENTS BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY**, 4th Edition. February 28, 2007.
- 14- GUERREIRO, A.C., GAGO, C.M.L., MIGUEL, M.G.C., ANTUNES, M.D.C. **THE EFFECT OF TEMPERATURE AND FILM COVERS ON THE STORAGE ABILITY OF ARBUTUS UNEDO L. FRESH FRUIT**. Scientia Horticulturae, v. 159, p. 96-102, 2013.
- 15- DANDLEN, A.S.; LIMA, A.S.; MENDES, M.D.; MIGUEL, M.G.; FALEIRO, M.L.; SOUSA, M.J.; PEDRO, L.G.; BARROSO, J.G.; FIGUEIREDO, A.C. **ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SIX PORTUGUESE THYME SPECIES ESSENTIAL OILS**. Flavour Fragr j 25: 150-155, 2010.

16. BOULANOUAR, B.; ABDELAZIZ, G.; AAZZA, S.; GAGO, C.; MIGUEL, M.G. **ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF EIGHT ALGERIAN PLANT EXTRACTS AND TWO ESSENTIAL OILS**. Industrial Crops and Products, v.46, p.85-96, 2013.
- 17- PRIETO, P.; PINEDA, M. AND AGUILAR, M. **SPECTROPHOTOMETRIC QUANTITATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY THROUGH THE FORMATION OF A PHOSPHOMOLYBDENUM COMPLEX: Specific Application to the Determination of Vitamin E**. Analytical Biochemistry, 269, 337-341, 1999.
- 18- MORAIS I.A.S. **INFLUÊNCIA DOS FATORES ABIÓTICOS NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS**. Hortic. bras. v. 27, n. 2 (Suplemento - CD Rom), agosto, 2009.
- 19- CARDOSO, M.G.; SHAN, A.Y.K.V.; PINTO, J.E.B.P.; FILHO, N.D. & BERTOLUCCI, S.K.V. **METABÓLITOS SECUNDÁRIOS VEGETAIS: VISÃO GERAL QUÍMICA E MEDICINAL**. Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2001.
- 20-NASCIMENTO, F.R.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; LIMA, R.K.; SALGADO, A.P.S.P.; GUIMARÃES, L.G.L. **EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA LONGA (*PIPER HISPIDINERVUM* C. DC.) E DO EMULSIFICANTE TWEEN @80 SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE ALTERNARIA ALTERNATA (FUNGI: HYPHOMYCETES)**. Acta Amazonica, 38(3): 503-508, 2008.
- 21- ZACARONI, L.M.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; PIMENTEL, F.A.; GUIMARAES, G.L.; SALGADO, A.P.S.P. **POTENCIAL FUNGITÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIPER HISPIDINERVUM (PIMENTA LONGA) SOBRE OS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS BIPOLARIS SOROKINIANA, FUSARIUM OXYSPORUM E COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES**. Acta Amazonica, 39(1): 193-198, 2009.
- 22- ADOM, K. K.; LIU, R. H. **ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GRAINS**. J Agric Food Chem, 50, 6182-6187, 2002.